

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
30 de Septiembre de 2004 (30.09.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/082711 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
A61K 39/106, 9/28

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2004/000005

(22) Fecha de presentación internacional:
19 de Marzo de 2004 (19.03.2004)

(25) Idioma de presentación: **español**

(26) Idioma de publicación: **español**

(30) Datos relativos a la prioridad:
2003-0061 20 de Marzo de 2003 (20.03.2003) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **INSTITUTO FINLAY. CENTRO DE INVESTIGACIÓN-PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEROS [CU/CU]**; Ave 27 No 19805 e/ 198 y 202, La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana, 11600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **TALAVERA CORONEL, Arturo [CU/CU]**; Calle J, No. 58. Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana, 10400 (CU). **AÑO LOPEZ, Gemma [CU/CU]**; Calle Vista Alegre, No. 254, apto 1, 10 de Octubre, Ciudad de la Habana, 10700 (CU). **CASTAÑO FERNÁNDEZ, Jorge, Luis [CU/CU]**; Edificio A 40, apto 1, Zona 4, Alamar, Ciudad de la Habana, 12500 (CU). **URRIBARRI HERNÁNDEZ, Evangelina [CU/CU]**; Calle 180, entre 1ra y 5ta, Reparto Flores, Playa, CIUDAD DE LA HABANA, 11600 (CU). **PINO NAVARRO, Yadira [CU/CU]**; Calle Línea, No. 1156, apto C, Vedado, Plaza, CIUDAD DE LA HABANA, 10400 (CU). **GARCÍA SANCHEZ, Hilda, María [CU/CU]**; Calle 31B, Edificio C 614, apto 8, Playa, CIUDAD DE LA HABANA, 11600 (CU). **BALMASEDA PEREZ, Tania [CU/CU]**; Calle H, apto 2, Plaza de la Revolución, CIUDAD DE LA HABANA, 10400 (CU).

(54) Title: **INACTIVATED VIBRIO CHOLERAE VACCINE IN TABLET FORM**

(54) Título: **VACUNA DE VIBRIO CHOLERAE INACTIVADA EN TABLETAS**

(57) Abstract: The invention relates to the field of vaccines and, in particular, oral cholera vaccines. The technical objective of the invention is the production of a tablet formulation of inactivated whole-cell *Vibrio cholerae* vaccines. The invention describes the vaccine product formulation.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con el campo de las vacunas, específicamente con las vacunas de aplicación oral contra el cólera. El objetivo técnico que persigue es obtener una formulación en tabletas de vacunas de células enteras inactivadas de *Vibrio cholerae*. La invención describe la formulación del producto vacunal.

WO 2004/082711 A1

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

2005 SEP 20 REC 2005 SEP 20

VACUNA DE *VIBRIO CHOLERA* INACTIVADA EN TABLETAS.**Rama de la Técnica**

La presente invención se relaciona con el campo de las vacunas, específicamente con las

5 vacunas de aplicación oral contra el cólera.

Técnica Anterior

El cólera es una enfermedad infecciosa, cuyo signo principal es diarrea aguda que se caracteriza por la aparición brusca de heces fecales acuosas y profusas, que pueden ser severas, pudiendo conllevar a la muerte en 5 horas, si el paciente no recibe tratamiento 10 adecuado. Se adquiere por vía oral, a partir de alimentos o aguas contaminadas. Hasta el presente se han producido siete pandemias, con altos índices de morbilidad y mortalidad. Afecta fundamentalmente a las poblaciones que habitan en regiones de bajo desarrollo o en condiciones de emergencia por catástrofes naturales, guerras u otras causas, que provoquen bajos niveles de higiene. También son susceptibles los viajeros que tengan como destino 15 regiones como las antes mencionadas (CDC/ NCID. Organización Panamericana de la Salud.

Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. En: Programa especial de publicaciones. Ed. Washington, D. C., Estados Unidos 1994).

Si bien el tratamiento con antibióticos y sales de rehidratación es efectivo, requiere de una atención médica primaria muy bien establecida y distribuida en toda la región debido al 20 rápido curso de la enfermedad.

Por otra parte, ha sido demostrado que, el padecer la enfermedad, induce protección específica y que esta se asocia con la presencia de anticuerpos vibriocidas en el suero, como indicador de protección para humanos (Glass, R. I., Svennerholm, A.M., Stoll, B.J., Khan, M.R., Hossain, K.M., Huq, M.I., Holmgren, J. 1983. Protection against cholera in breast-fed 25 children by antibodies in breast milk. N. Engl. J. Med. 308: 1389-1392 y

Jertborn, M., Svennerholm, A. M., Holmgren, J. 1993. Evaluation of different immunization schedules for oral B subunit vaccine in Swedish volunteers. Vaccine. 10: 130-2). Por tales motivos, han sido desarrolladas diferentes clases de vacunas contra el cólera, unas de células enteras inactivadas y otras de células vivas atenuadas.

30 Las vacunas de células enteras inactivadas con fenol y de aplicación parenteral, fueron retiradas del mercado por su corta (3 a 6 meses) y baja (30 % a 60 %) protección, además de ser altamente reactogénica, desarrollando en los vacunados, eritema, dolor local, induración, fiebre y cefalea; (OMS. 1991. Reunión sobre la vacuna contra el cólera. Informe final. Washington, D.C.)

Otra de las alternativas vacunales ha sido la vacuna de células enteras inactivada con bilis (Bilivacuna), esta vacuna de aplicación oral, solamente presenta resultados moderados en la protección, sin lograr un desarrollo industrial; (Svennerholm, A. M. y Holmgren, J. 1986.

Oral combined B subunit-whole cell cholera vaccine. In J. Holmgren A. Lindberg and R.

5 Mollby (ed). Development of vaccines and drugs against diarrhea. 11th Novel Conference, Stockholm, 1985. Student litteratur, Lund, Sweden. p.33-43).

La vacuna de células enteras inactivadas con calor y formalina combinada con la subunidad B de la toxina colérica (B-WC) se ha podido constatar que solo ofrece una protección moderada (60%) a los tres años de aplicada; (Holmgren, J., Svennerholm, A. M., Lönnroth, I., Fall-

10 Persson, M., Markman, B. y Lundbäck, H. 1977. Development of improved cholera vaccine based on subunit toxoid. *Nature* 269:602-604); pero es sumamente cara y tecnológicamente compleja su producción, dado por la implicación de la obtención y purificación de la subunidad B de la toxina colérica (Tayot, J. L., Holmgren, J., Svennerholm, L., Lindblad, M., Tardy, M. 1981. Receptor-specific large scale purification of cholera toxin on silica beads 15 derivatized with lyso-GM1 ganglioside. *Eur. J. Biochem* 113:249-258).

Una variante de la anteriormente mencionada, pero empleando la subunidad B de la toxina colérica obtenida por vía recombinante (rB-WC), aunque es segura continua ofreciendo solo una protección del 60 % a los tres años de aplicada, y además requiere de un engorroso proceso de preparación en la estación de vacunación. La misma se presenta en dos sobres

20 multicapas, uno con una mezcla de sales en polvo y el otro con las cepas de *Vibrio cholerae* liofilizadas. En el momento de la vacunación, debe resuspenderse en agua el primero y en una solución de sales en agua el segundo y luego administrar la solución de sales por vía oral y 15 minutos después la suspensión con las cepas por la misma vía (Sánchez, J. L., Holmgren, J. 1989. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B Subunit in *Vibrio cholerae* 25 as basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:481-485).

Otra de las vacunas de células enteras inactivadas existentes en le estado del arte es una variante similar a la anterior, pero en la que se sustituye en su composición a la cepa de *Vibrio cholerae* Cairo 50 (Clásica, Ogawa) por la cepa 569B (El Tor, Inaba). Presenta una protección aceptable (66%) hasta los 8 a 10 meses posvacunación. Su presentación es una mezcla de

30 cepas de diferentes serotipos y biotipos de *Vibrio cholerae*, y es presentada en un frasco con la suspensión de cepas y un sobre con una mezcla de sales (Trach, D. D., Clemens, J. D., Ke, N. T., Thuy, H. T., Son, N. D., Canh, D. G., Hang, P. V. D, Rao, M. R. 1997. Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Vietnam. *Lancet*. 349: 231-235), sin embargo para su aplicación, como en la anterior, se requiere solubilizar la mezcla de sales en agua y

administrarla por vía oral, para luego de 15 minutos aplicar por la misma vía el contenido del frasco con la suspensión de la mezcla de células. Esta formulación y forma de presentación de la vacuna hace que el procedimiento de aplicación sea lento y muy cuidadoso, exigiendo de tiempo y personal calificado, que encarecen su aplicación.

5 Otros estudios han estado encaminados al desarrollo de candidatos vacunales basados en vacuna de células vivas, atenuadas y de aplicación oral. De este tipo de vacunas se han desarrollado varias, como es el caso de la cepa CVD103 y la JBK70 las que resultaron de la eliminación, en cepas virulentas, de los genes que codifican para la subunidad A de la toxina colérica, ambas reportaron altos índices de protección, pero son inaceptablemente
10 reactogénicas, provocando en los vacunados diarreas, vómitos y dolores abdominales (OMS. 1991. Reunión sobre la vacuna contra el cólera. Informe final. Washington, D.C.).

La vacuna CVD103 HgR, está basada en la cepa CVD103, a la cual, adicionalmente se la insertó un gen de resistencia al mercurio, como elemento de diferenciación de las cepas epidémicas, su aplicación es segura y mostró buenos niveles de protección en ensayos en
15 voluntarios, aunque requiere de altas dosis para lograr una alta respuesta inmunogénica (OMS. 1991. Reunión sobre la vacuna contra el cólera. Informe final. Washington, D.C. y Holmgren, J., and Svennerholm, A. M. 1999. Vaccines Against Diarrheal Diseases. In Perlmann, P. and Wigzell, H. [ed]. Vaccines. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. p: 290-328). Esta cepa, requiere para su producción de sistemas completamente cerrados
20 (Cryz, S.J. and Gluck, R., 1997. Large-Scale production of live attenuated bacterial and viral vaccines. En New generation Vaccine. Second Edition. Ed. Levine, M.M., Woodrow, G.C., Kaper, J.B. y Cobon, G.S. Library of Congress Cataloging in Publication Data. New York. P: 1153 – 1163), su forma de presentación es como la descrita anteriormente, por lo que presenta las mismas dificultades en su aplicación.

25 Las vacuna viva atenuada basada en la cepa 638, proviene de la cepa epidémica C7258, a la cual se le eliminó el fago de virulencia CTXφ e incluyó el marcador vacunal *celA* en el gen *hap* que codifica la hemaglutinina proteasa, su aplicación en ensayos en voluntarios resultó ser segura y mostró respuesta inmune adecuada (Benítez, J.A., García L., Silva A., García, H., Fando, R., Cedré, B., Pérez, A., Campos, J., Rodríguez, B., Pérez, J.L., Balmaseda, T., Pérez,
30 O., Ramírez, M., Ledón, T., Díaz, M., Lastre, M., Bravo, L. and Sierra, G. 1999. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTXφ-negative, haemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. Infect. Immun. 67: 539-545), sin embargo esta cepa, requiere para su producción y aplicación de sistemas similares a las dos anteriores y por consiguiente presenta las mismas dificultades.

Las vacunas basadas en la atenuación de cepas de *Vibrio cholerae* que emplearon las cepas Perú-3, Bah-3 y Bang-3, aunque resultaron inmunogénicas fueron inaceptablemente reactogénicas (Taylor, D.N, Killen, K.P., Hack, D.C., Kenner, J.R., Coster, T.S., Beatle, D.T., Ezzell, J., Hyman, T., Tropa, A., Sjogrem, M.H., Friedlander, A., Mekalanos, J.J., Sadoff, J.C.

5 1994. Development of a live, oral, attenuated vaccine against El Tor cholera. *J. Infect. Dis.* 170:1518-1523).

La vacuna que incluye la cepa Perú15, está basada en la cepa Perú-3, su aplicación es segura y mostró buenos niveles de protección en ensayos en voluntarios (Kener, J.R., Coster, T.S., Taylor, D.N., Troffa, A.F., Barrera-Oro, M., Hyman, T., Adams, J.M., Beattie, D.T., Killeen, 10 K.P., Spriggs, D.R., Mekalanos, J.J., Sadoff, J.C. 1995. Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J. Infect. Dis.* 72:1126-1129). Sin embargo, aún no han realizado estudios clínicos y para su producción y aplicación presenta, como las anteriores las mismas dificultades.

A modo de conclusión, es importante señalar que hasta el momento no existen antecedentes 15 en el estado del arte que describan ninguna formulación sólida del tipo de los comprimidos; como es el caso que atañe a la presente invención.

Divulgación de la Invención

Esta invención describe una nueva formulación de vacuna y sus usos en la terapéutica. En particular, se aborda la formulación de una vacuna inactivada contra *Vibrio cholerae* y su 20 presentación en tabletas.

La nueva formulación vacunal de la presente invención comprende: Células enteras inactivadas de *Vibrio cholerae*, aglutinantes, lubricantes, revestimiento entérico, sustancias de relleno y desintegrantes para su presentación final en forma de tabletas, de manera tal que los mismos sean estables y no interfieran entre si.

25 Resultó sorprendente que el producto terminado, presenta capacidad antigénica e inmunogénica similar a la presentada por las células inactivadas que constituyen el principio activo de la formulación.

La presente invención provee una vacuna compuesta por células inactivadas de cepas de *Vibrio cholerae* del Serogrupo O139, o del Serogrupo O1, pertenecientes al biotipo clásico o 30 al biotipo El Tor de los serotipos Ogawa o Inaba, pudiendo las cepas ser salvajes o atenuadas.

La formulación vacunal objeto de esta invención contiene células inactivadas de *Vibrio cholerae* preferiblemente entre 10^9 y 10^{11} bacterias inactivadas por tableta.

La formulación vacunal podrá contener dentro de su composición los siguientes aglutinantes: polivinilpirrolidona, gelatina, carboximetil celulosa, debiendo encontrarse estos en relación

con la masa total de la tableta entre el 1% y el 5%; lubricantes: carboximetil almidón sódico, estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal y talco, en relación con la masa total de la tableta entre el 0,25% y el 1,5%; revestimiento entérico: acetoftalato de celulosa, dietiloftalato de celulosa, goma laca al 10% y dióxido de titanio, debiendo encontrarse estos en relación con

5 la masa total de la tableta entre el 1% y el 2%; sustancias de relleno: lactosa y almidón de maíz debiendo encontrarse estos en relación con la masa total de la tableta entre el 65% y el 80% y desintegrantes: croscaramelosa sódica, almidón de maíz y celulosa microcristalina debiendo encontrarse estos en relación con la masa total de la tableta entre el 5% y el 15% respectivamente.

10 Es importante señalar además que con la presente formulación se logra por primera vez obtener un preparado vacunal que combina compuestos químicos sintéticos con material biológico, especialmente células, logrando que resista las agresiones químicas y físicas características de la tecnología empleado sin afectar las propiedades inmunológicas principales del principio activo.

15 El objeto de la presente invención será descrito a través de los siguientes ejemplos de realización.

Ejemplo 1: Estudio de posibles interferencias de los excipientes de las tabletas en la técnica ELISA en la determinación de LPS de *Vibrio cholerae*.

20 Para ello se evaluaron; la células inactivadas y mezclas de esta con cada uno de los excipientes, así como disoluciones de los excipientes por separado. Se utilizó como control positivo en la técnica la células inactivadas. Los excipientes que se emplearon en este ejemplo fueron: carboximetil almidón sódico, croscaramelosa sódica, polivinil pirrolidona, talco, estearato de magnesio, dióxido de titanio, dióxido de silicio coloidal, almidón de maíz y

25 lactosa.

La técnica ELISA se realizó como se describe a continuación:

1. Recubrir las placas de poliestireno (Maxisorp, Nunc, Dinamarca) con 100uL/ pozo de una mezcla células - excipientes disueltos en PBS. Incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda.
- 30 2. Lavar las placas con agua tween-20 0.05% entre cada paso del ensayo inmunoenzimático.
3. Bloquear las placas con 150 µL/pozo de leche descremada al 1% en PBS. Incubar 1h a 37°C en cámara húmeda.
4. Añadir 100 µl/pozo de anticuerpo monoclonal anti LPS.

5. Añadir 100 μ l/pozo de anticuerpo anti IgG de ratón, conjugados con peroxidasa de rábano picante tipo VI (Sigma Chemical Co. Saint Louis MO) diluido en PBS 0.05% tween 20, 1% de leche descremada. Incubar 2h a temperatura ambiente en cámara húmeda.

6. Revelar la reacción con 100 μ L/pozo de una solución de o-fenilendiamina (Sigma Chemical Co. Saint Louis a una concentración de 0.4 mg/mL en tampón citrato 0.1M pH 4.5 conteniendo 0.01% de H_2O_2 .

7. Detener la reacción a los 30 min. de añadido el sustrato con 50 μ L/pozo de una solución de 2.5 M de H_2SO_4 y leer la placa a una longitud de onda de 492 nm en un lector de microplacas .

10. Los resultados mostraron que no hay interferencias entre los excipientes utilizados y la técnica analítica, como se puede observar en la figura 1, donde las mezclas de los excipientes con la células inactivadas presentan valores similares a los de la células inactivadas sola, mientras que los excipientes solos mostraron valores significativamente inferiores.

15. **Ejemplo 2:** Determinación de posibles interferencias de los excipientes con el principio activo de la vacuna.

Para este estudio de posibles interferencias se determinó la antigenicidad por ELISA (como se describe en el Ejemplo 1) de las mezclas de la suspensión de células de *Vibrio cholerae* inactivado con los diferentes excipientes, las mezclas fueron divididas en dos partes iguales e 20 incubadas unas a 4 °C y otras a 28 °C. El estudio se realizó a tiempo cero y a los 30 días de incubación. Los excipientes evaluados en este ejemplo de realización fueron: lactosa, almidón, carboximetil almidón sódico, croscarmelosa, polivinil pirrolidona, talco, estearato de magnesio y dióxido de titanio.

Los resultados indican la no interferencia entre los excipientes y la antigenicidad del 25 lipopolisacárido de las células inactivadas. Se mantuvieron los valores del ELISA durante los 30 días de exposición, tanto a 4 °C como a 28 °C (Figura 2)

Ejemplo 3: Antigenicidad de la vacuna.

La antigenicidad de la vacuna se determinó mediante la aplicación de un ELISA de 30 inhibición para detectar lipopolisacárido (LPS) de *Vibrio cholerae* en las tabletas.

Para ello se procesaron como muestras, disoluciones de las tabletas, LPS Ogawa de *V. cholerae*, LPS O139 de *V. cholerae*, una suspensión de células vivas de *V. cholerae* El Tor Ogawa y una suspensión de células inactivadas.

La técnica ELISA se realizó como se describe a continuación:

Recubrir las placas de poliestireno (Maxisorp, Nunc, Dinamarca) con 100uL/ pozo de LPS Ogawa de *V. cholerae* a una concentración de 25 µg/mL disueltos en disolución amortiguadora de fosfato (PBS). Incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Lavar las placas con una disolución en agua de tween-20 al 0.05% entre cada paso del ensayo

5 inmunoenzimático.

Bloquear las placas con 150 uL/pozo de leche descremada al 1% en PBS. Incubar 1h a 37°C en cámara húmeda

Añadir 100 uL de muestras previamente incubadas 1h a temperatura ambiente en diluciones seriadas 1:2 con anticuerpos monoclonales anti LPS Ogawa, disueltos en PBS 0.05% tween

10 20 a una dilución de 25 ug/ml. Incubar 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Añadir 100 uL/pozo de anticuerpo anti IgG especie específico conjugado con peroxidasa de rábano picante tipo VI (Sigma Chemical Co. Saint Louis MO) diluido en PBS 0.05% tween 20, 1% de leche descremada. Incubar 2h a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Revelar la reacción con 100 uL/pozo de una solución de o-fenilendiamina (Sigma Chemical

15 Co. Saint Louis a una concentración de 0.4 mg/mL en tampon citrato 0.1M pH 4.5 conteniendo 0.01% de H₂O₂.

Detener la reacción a los 30 min. De añadido el sustrato con 50 uL/pozo de una solución de 2.5 M de H₂SO₄ y leer la placa a una longitud de onda de 492 nm en un lector de microplacas del tipo de Titerkek Multiskan Plus (Flow Laboratories, USA) .

20 Los resultados mostraron una alta inhibición en la prueba ELISA al utilizar como muestra la suspensión de las tabletas, con valores de inhibición similares a los obtenidos con las células vivas, con la células inactivadas y con el LPS Ogawa, no presentándose inhibición con el LPS O139. (Figura 3). Todo ello mostró que la actividad antigénica de la células inactivadas se mantiene en la formulación final sin alteración

25

Ejemplo 4. Inmunogenicidad de la vacuna.

La inmunogenicidad de la vacuna fue investigada en conejos mediante la inoculación intraduodenal de las muestras problemas. La determinación de la cinética de anticuerpos séricos, se evaluó por las técnicas ELISA y Vibriocida. Para ello se utilizaron como muestras

30 problemas, suspensiones de las tabletas y de células inactivadas de *V. cholerae* El Tor Ogawa.

Para la inoculación intraduodenal se realizó una laparotomía, se expuso el duodeno y se inoculó en el lumen duodenal 5 mL de una tableta resuspendida, o de un cultivo inactivado de la cepa vacunal o de solución salina. La cinética de anticuerpos séricos se determinó mediante ELISA y Vibriocida.

Técnica ELISA para la determinación de anticuerpos IgG anti lipopolisacáridos (LPS).

1. Recubrir placas de poliestireno de 96 pozos Nunc, Maxisorp con LPS puro a 25 µg/mL. Incubar toda la noche a 4°C o 2h a 37°C.

2. Lavar 3 veces con agua tween 20 al 0.05%.

- 5 3. Bloquear con 150 µL/pozo con una solución de leche descremada al 2% en PBS, 1h a 37°C.

4. Lavar 3 veces.

5. Hacer diluciones seriadas del suero problema en PBS-Tween 0.05% . Incubar 2 h a TA.

6. Lavar 3 veces Idem.

7. Añadir el conjugado anti IgG-HRP especie diluida en leche 1% en PBS-T e incubar 1 h a 10 temperatura ambiente.

8. Lavar 6 veces.

9. Revelar con o-fenilendiamina 1 mg/mL y H₂O₂ 30% en buffer Citrato pH 4.5.

10. Leer absorbancia a 492 nm.

Técnica Vibriocida, para la determinación de anticuerpos bactericidas.

- 15 Se utilizan placas de fondo plano estériles.

1. Añadir 50 µL de los sueros problemas en los primeros pocillos. En los restantes 25 µL de salina.

2. Realizar diluciones seriadas y desechar los últimos 25 µL

3. Añadir 25 µL de la mezcla bacteria complemento (2,5 mL por placa) e 20 incubar 1 h a 37°C.

4. Añadir medio de cultivo BHI (para 100 mL de medio, 125 µL de púrpura de Bromocresol y 10 mL de glucosa (estos 10 mL se deben eliminar del medio).

5. Homogenizar la placa manualmente e incubar 3h a 37°C.

6. El título se define como la mayor dilución del suero que inhibió el 25 crecimiento bacteriano, lo cual se determina por invariabilidad del color del medio.

Preparación de la mezcla de bacteria – complemento.

1. A partir de la cepa de *V. cholerae* conservada, se siembran 2 cuñas o placas de agar BHI y se incuban junto con dos cuñas sin sembrar, a 37°C de 18-24 horas.

2. Se toman colonias aisladas de las placas o varias asadas de las cuñas y se 30 siembran las cuñas precalentadas e incubar 4 h a 37°C.

3. Lavar el crecimiento de las cuñas con solución salina estéril pH 7 y ajustar el lavado a D.O= 0,9-0,95.

4. La células inactivadas ajustadas se diluyen 1:10.

5. Se realiza la mezcla bacteria-complemento donde:

- El complemento (suero de curiel o humano libre de anticuerpos vibriocidas se diluye 1:5 con salina estéril fría.
- Mezclar volúmenes iguales de complemento diluido y las células inactivadas previamente preparada.

5

Los resultados demuestran que no hay diferencias, entre la formulación en tabletas con respecto a la células inactivadas, en la capacidad inmunogénica de inducir anticuerpos anti-lipopolisacáridos en conejos, detectados por ELISA (Figura 4 A), y anticuerpos Vibriocidas (Figura 4 B). Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos en los Ejemplos 1, 2 y 3, 10 demuestran que la formulación en tabletas descrita en esta invención es tan antigénica e inmunogénica en modelos animales como las células inactivadas antes de la formulación, tanto por la detección de los antígenos en la formulación final en las tabletas, como por su actividad funcional al inducir anticuerpos vibriocida.

15 **Ventajas de la solución propuesta:**

La solución propuesta es superior a las soluciones anteriores por lograr presentar un producto vacunal altamente inmunogénico, tanto en su capacidad de inducir anticuerpos anti-lipopolisacárido detectados por inmunoensayo, como de anticuerpos vibriocidas; así como de fácil aplicación, sin los riesgos potenciales que involucran las vacunas vivas manipuladas 20 genéticamente, ni las dificultades en la administración del producto, que presentan el resto de las vacunas inactivadas antes desarrolladas.

Breve descripción de las figuras

25 **Figura 1.** Estudio de posibles interferencias de los excipientes de las tabletas con la técnica ELISA en la determinación de LPS de *Vibrio cholerae*.

C01 a C09 mezcla de excipientes con las células inactivadas. C10 a C18 excipientes independientes y C19 células inactivadas.

Excipientes en cada muestra: C01 y C10 almidón; C02 y C11 carboximetil almidón sódico; 30 C03 y C12 croecaramelosa; C04 y C13 polivinil pirrolidona; C05 y C14 talco; C06 y C15 estearato de magnesio; C07 y C16 dióxido de titanio; C08 y C17 dióxido de silicio coloidal; C09 y C18 almidón 1500; C19 células inactivadas.

Figura 2. Determinación de posibles interferencias de los excipientes con la antigenicidad del principio activo de la vacuna. Se representan en el eje de las ordenadas los por cientos de la

10

lectura promedio del ELISA de la muestras incubadas 30 días respecto a la lectura del ELISA de igual muestra a tiempo cero. Conservadas a 4°C (Figura 2 A) y conservadas entre 26 a 28 °C (Figura 2 B). Los excipientes evaluados en este ejemplo fueron:

1. - lactosa, 2. - almidón, 3. - carboximetil almidón sódico, 4. - croscaramelosa, 5. - polivinil pirrolidona, 6. - talco, 7. - esteárate de magnesio, 8. - dióxido de titanio y 9. - células inactivadas.

Figura 3. Aplicación de un ELISA de inhibición de Anticuerpos Monoclonales Anti-LPS con células inactivadas formulación final en tabletas para detectar la antigenicidad del lipopolisacárido (LPS) de *Vibrio cholerae* en las tabletas.

10 **Figura 4.** Títulos séricos de conejos inoculados con células inactivadas o con vacuna formulada en tableta. Los títulos anti lipopolisacárido de *V. cholerae* O1, Ogawa, detectados por ELISA se muestran en la figura 4 A y los títulos vibriocidas en la figura 4 B.

15

20

11
REIVINDICACIONES

1. Composición vacunal contra el cólera caracterizada porque comprende
 - a. células inactivadas de *Vibrio cholerae*.
 - b. aglutinantes
 - c. lubricantes
 - d. revestimiento entérico
 - e. sustancia de relleno
 - f. desintegrantes
- 5 2. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 1, caracterizada porque las células inactivadas proceden de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae*.
3. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 2, caracterizada porque las células pertenecen al serogrupo O139
- 10 4. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 3, caracterizada porque las células pertenecen al serogrupo O1
5. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 4, caracterizada porque las células pertenecen al biotipo El Tor o al Clásico
6. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 5, caracterizada porque las células pertenecen al serotipo Ogawa o al Inaba
- 20 7. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 1, caracterizada porque las células inactivadas proceden de cepas salvajes de *Vibrio cholerae*.
8. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 7, caracterizada porque las células pertenecen al serogrupo O139
9. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 8, caracterizada porque las células pertenecen al serogrupo O1
- 25 10. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 9, caracterizada porque las células pertenecen al biotipo El Tor o al Clásico
11. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 10, caracterizada porque las células pertenecen al serotipo Ogawa o al Inaba
- 30 12. Composición vacunal contra el cólera según reivindicaciones de la 1 a la 11 caracterizada por contener entre 5×10^9 células y 10^{11} células por tableta.
13. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 1, caracterizada porque los aglutinantes pueden seleccionarse del grupo polivinilpirrolidona, gelatina y carboximetil celulosa.

14. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 13 caracterizada porque los aglutinantes se encuentran entre el 1% y el 5% respecto a la masa de cada tableta.

5 15. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 1, caracterizada porque los lubricantes pueden seleccionarse del grupo carboximetil almidón sódico, estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal y talco.

16. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 15 caracterizada porque los lubricantes se encuentran entre el 0,25% y el 1,5% respecto a la masa de cada tableta.

10 17. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 1, caracterizada porque el revestimiento entérico pueden seleccionarse del grupo acetoftalato de celulosa, dietiloftalato de celulosa, goma laca al 10% y dióxido de titanio.

15 18. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 17 caracterizada porque el revestimiento entérico se encuentra entre el 1% y el 2% respecto a la masa de cada tableta.

19. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 1, caracterizada porque las sustancias de relleno pueden seleccionarse del grupo lactosa y almidón de maíz

20 20. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 19 caracterizada porque las sustancias de relleno se encuentran entre el 65% y el 80% respecto a la masa de cada tableta.

21. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 1, caracterizada porque los desintegrantes pueden seleccionarse del grupo croscaramelosa sódica, almidón de maíz y celulosa microcristalina.

25 22. Composición vacunal contra el cólera según reivindicación 21 caracterizada porque los desintegrantes se encuentran entre el 1% y el 6% respecto a la masa de cada tableta.

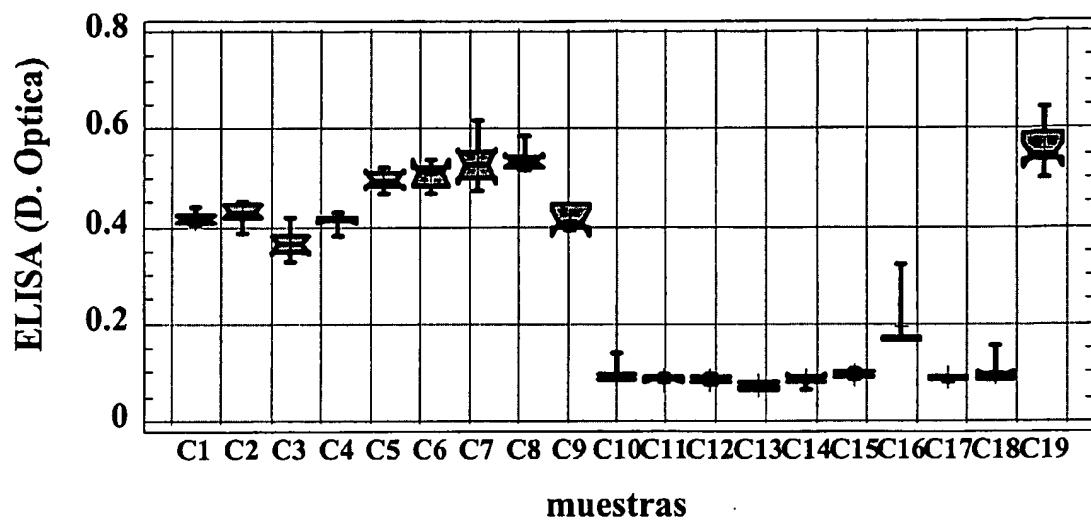
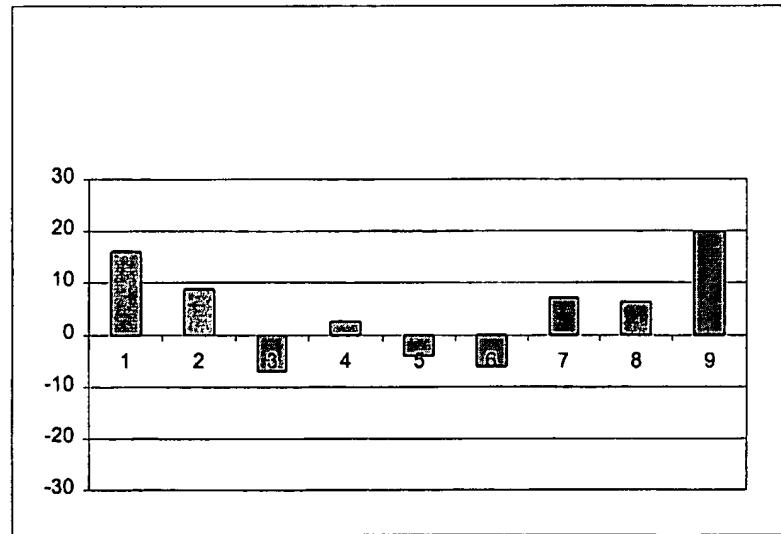
Figura 1**Figura 2-A**

Figura 2-B

101549992

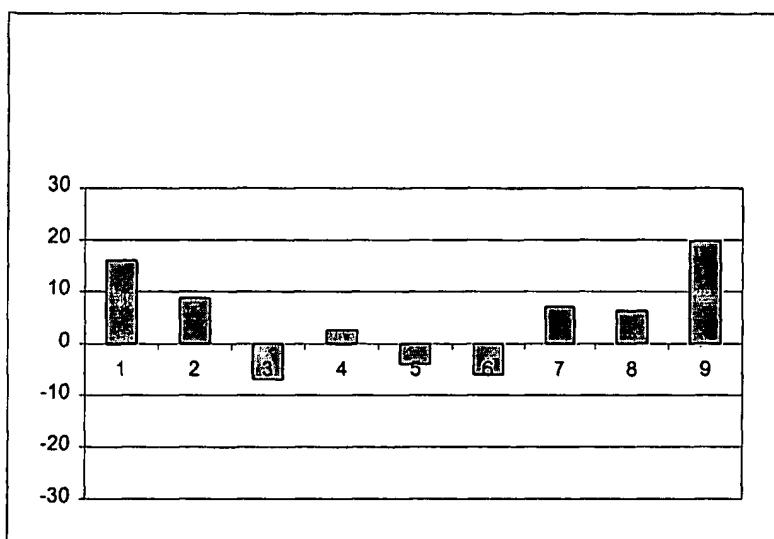


Figura 3

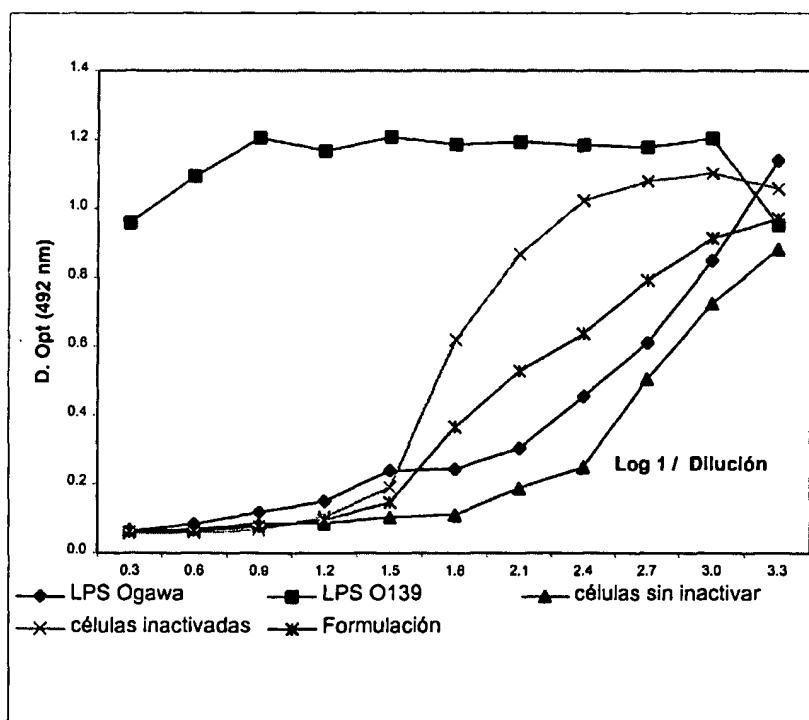


Figura 4-A

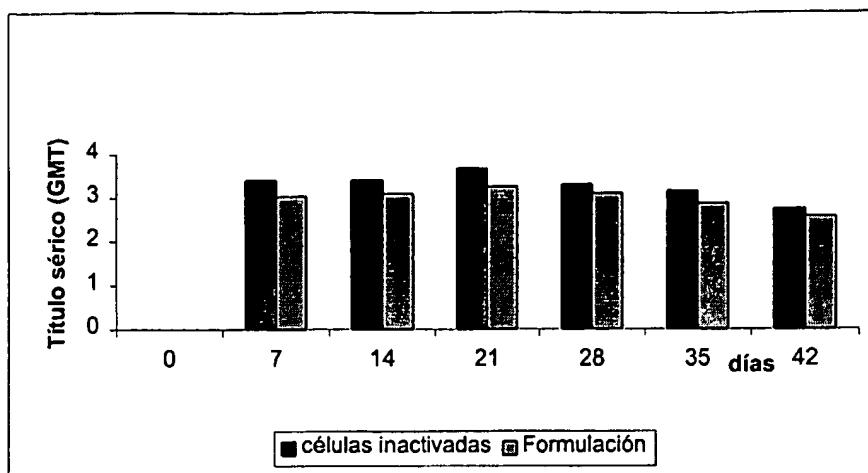
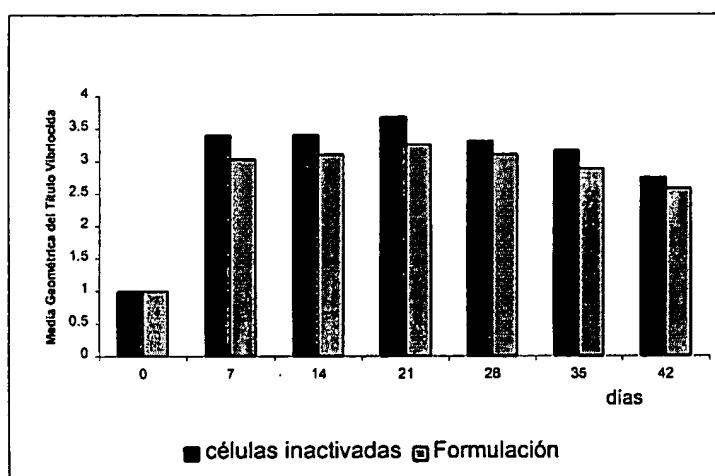


Figura 4 B



BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2004/000005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 A61K39/106, 9/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, XPESP, BIOSIS, NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BENÍTEZ, J. A., GARCÍA, L., SILVA, A. et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX ϕ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. Infection and Immunity. February 1999, Vol 67, Nº 2, pages 539 - 545.	1, 2, 4-7, 9-22
Y	US 4873090 A (CLANCY, R. L.) 10.10.1989. Column 1 - column 3, line 11.	1-22
Y	LEDÓN, T., VALLE, E., VALMASEDA, T. et al. Construction and characterisation of O139 cholera vaccine candidates. Vaccine. 07 March 2003, Vol.21, pages 1282-1291.	1-3, 7,8, 12-22
A	EP 0572942 A2 (POLI INDUSTRIA CHIMICA S.P.A.) 28.05.1993. Whole document.	1, 13-22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 May 2004 (19.05.04)Date of mailing of the international search report
28 June 2004 (28.06.04)Name and mailing address of the ISA/
S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ CU 2004/000005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4873090 A	10.10.1989	WO1986/005691 A1 ZA 8602145 A AU 5629886 A NO 8604764 A EP 0225329 A4, B1 FI 8604769 A JP 62502262 T DK 8605677 A CA 1271137 A	09.10.1986 24.09.1986 23.10.1986 02.02.1987 03.05.1989 24.11.1986 03.09.1987 26.11.1986 03.07.1990
EP 0572942 A2	28.05.1993	IT 1260505 B HU 75158 A DE 69309540 E ES 2101164 T3	09.04.1996 28.04.1997 15.05.1997 01.07.1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Solicitud internacional nº

PCT/ CU 2004/000005

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K39/106, 9/28

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, XPESP, BIOSIS, NPL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	BENÍTEZ, J. A., GARCÍA, L., SILVA, A. et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX ϕ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. Infection and Immunity. Febrero 1999, Vol 67, Nº 2, páginas 539 - 545.	1, 2, 4-7, 9-22
Y	US 4873090 A (CLANCY, R. L.) 10.10.1989. Columna 1 – columna 3, línea 11.	1-22
Y	LEDÓN, T., VALLE, E., VALMASEDA, T. et al. Construction and characterisation of O139 cholera vaccine candidates. Vaccine. 07 Marzo 2003, Vol.21, páginas 1282-1291.	1-3, 7,8, 12-22.
A	EP 0572942 A2 (POLI INDUSTRIA CHIMICA S.P.A.) 28.05.1993. Todo el documento.	1, 13-22

 En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

• Categorías especiales de documentos citados:	
“A”	documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
“E”	solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
“L”	documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
“O”	documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
“P”	documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
“T”	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
“X”	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
“Y”	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
“&”	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
19 Mayo 2004 (19.05.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

28 JUN 2004 28.06.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 349 3047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ CU 2004/000005

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 4873090 A	10.10.1989	WO1986/005691 A1 ZA 8602145 A AU 5629886 A NO 8604764 A EP 0225329 A4, B1 FI 8604769 A JP 62502262 T DK 8605677 A CA 1271137 A	09.10.1986 24.09.1986 23.10.1986 02.02.1987 03.05.1989 24.11.1986 03.09.1987 26.11.1986 03.07.1990
EP 0572942 A2	28.05.1993	IT 1260505 B HU 75158 A DE 69309540 E ES 2101164 T3	09.04.1996 28.04.1997 15.05.1997 01.07.1997